

75

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. August 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/070269 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/43,
31/404, 31/195, A61P 25/28, 27/02 // (A61K 38/43, 33:24)
(A61K 31/404, 33:24) (A61K 31/195, 33:24)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00415

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Februar 2003 (12.02.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 06 723.6 18. Februar 2002 (18.02.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SCHRAERMAYER, Ulrich [DE/DE]; Wein-
stockstrasse 4, 41466 Neuss (DE).

(74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Dehmel
& Bettenhausen, Patentanwälte, Müllerstrasse 1, 80469
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TREATMENT FOR DISEASES OF THE EYE, INNER EAR AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM

A1 (54) Bezeichnung: THERAPIE VON ERKRANKUNGEN DES AUGES, DES INNENOHRES UND DES ZENTRALEN NER-
VENSYSTEMS

WO 03/070269 A1 (57) Abstract: The invention relates to 5,6-dihydroxyindol (DHI), 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) and/or 5-S-
cysteinyldopa (CD) as medicaments, in addition to their use and to the use of tyrosinase for producing a medicament for preventing
or treating diseases caused by oxidative stress. The invention also relates to the use of gene therapy vectors comprising a tyrosinase
gene, in addition to cells modified by a tyrosinase gene.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure
(DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyldopa (CD) als Arzneimittel, sowie deren Verwendung und die Verwendung der Tyrosinase zur
Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von Erkrankungen, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden.
Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Gentherapievektoren, umfassend ein Tyrosinasegen. Die vorliegende
Erfindung betrifft ferner mit einem Tyrosinasegen modifizierte Zellen.

Therapie von Erkrankungen des Auges, des Innenohres und des Zentralen Nervensystems

Die vorliegende Erfindung betrifft 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyl-dopa (CD) als Arzneimittel, sowie deren Verwendung und die Verwendung der Tyrosinase zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von Erkrankungen, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Gentherapievektoren, umfassend ein Tyrosinasegen. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner mit einem Tyrosinasegen modifizierte Zellen.

Tyrosinase ist das wichtigste Enzym zur Synthese von Melanin, ein Pigment welches in Zellen der Haut, des Auges und des Zentralen Nervensystems vorkommt.

Tyrosinase ist ein integrales Membranglycoprotein aus 529 Aminosäuren. Das Enzym katalysiert die Hydroxylierung von Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und anschließend dessen Überführung in Dopaquinon. Über verschieden Zwischenschritte (Stage-III-Melanosom), die größtenteils spontan ablaufen können, entsteht ferner Melanin. Zu diesen Zwischenstufen gehören 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindol-2-carboxylsäure (DHICA), und 5-S-Cysteinyl-dopa (CD).

Nach heutigem Wissensstand findet die Melaninbildung im retinalen Pigmentepithel von Säugetieren inclusive des menschlichen Auges nur pränatal statt ^{2,5}. Beim Menschen ist die Tyrosinase im retinalen Pigmentepithel nur pränatal bis etwa 6 Wochen vor Ende der Schwangerschaft aktiv und wird dann nicht mehr gebildet ⁴. Im Auge findet man Melanin bzw. die Tyrosinase in embryonal unterschiedlichen Geweben: in der Uvea, bestehend aus Iris und Chorioidea sowie im Pigmentepithel von Retina (RPE), Iris (IPE) und Ziliarkörper.

Das einzige pigmentierte Gewebe, von dem behauptet wird, dass hier postnatal keine Melaninsynthese mehr stattfindet ist das RPE. Dies geht auf eine Arbeit von Miyamoto und Fitzpatrick (1957) ⁴ zurück, in der gezeigt wurde, dass im postnatalen RPE keine Tyrosinase-Aktivität zu finden ist. Das Enzym selbst wurde nach dem bisherigen Stand der Technik auf Proteinebene in RPE Zellen von adulten Säugetieren oder Menschen nicht nachgewiesen und auch es wurden auch keine weiterführenden Studien unternommen.

Während Melanin in der Haut vorwiegend einen physikalischen Lichtschutz darstellt, sind seine Funktionen im Auge komplexer ⁶. Einen physikalischer Lichtschutz bietet lediglich das Melanin in der Iris (Blendenfunktion). Das Melanin im Retinalen Pigmentepithel (RPE) liegt anatomisch von außen gesehen hinter den zu schützenden sensiblen Photorezeptoren der Netzhaut (NH). Das Pigment kann hier durch Absorption die Streustrahlung reduzieren oder Gewebe, z. B. Endothelzellen der Aderhaut, schützen. Auch hat Melanin chemische Schutzwirkung. Als Radikalfänger reduziert Melanin die Entstehung gewebetoxischer Lipidperoxidationen, die im RPE durch hohe Sauerstoffkonzentrationen, Lichteinfall von außen und ausgeprägte Phagozytose-Aktivität entstehen. Die hohe Sauerstoffkonzentration ist auf eine besonders gute Durchblutung der darunter liegenden Chorioidea zurückzuführen. Die Phagozytose abgeschiedener Außensegmente von Photorezeptoren der Netzhaut ist eine der wesentlichen Aufgaben des RPE und verursacht zusätzlichen oxidativen Stress ¹. Bei der Phagozytose wird extrazellulär und intrazellulär Superoxid frei welches sekundär die Bildung von Hydroxylradikalen und Wasserstoffsuperoxid induziert ¹.

Melanin schützt hier, indem es freie Radikale zu molekularem Sauerstoff und Hydrogenperoxid reduziert. Melanin wirkt daher auch bei Entzündungen des Auges protektiv. Melanin stellt ferner einen wichtigen Zink-Speicher dar, da es in der Lage ist, Schwermetalle, z.B. Zink, Medikamente und andere zytotoxische Substanzen zu binden und zu speichern. Das RPE enthält eine hohe Zink-Konzentration, dessen größter Anteil an Melanin gebunden ist ⁷. Da Zink ein notwendiger Cofaktor für ca. 300 Enzyme, z.B. der Superoxiddismutase, der Carboanhydrase, der retinalen Dehydrogenase, der Collagenase und der Katalase ⁸ ist, kann ein Verlust von Melanin, z.B. bei AMD, mit einem Funktionsverlust dieser Enzyme einhergehen. Diese zuvor genannten Enzyme haben besonders im Auge wichtige Funktionen. Die Katalaseaktivität ist im Auge von älteren Menschen und besonders bei AMD Patienten reduziert ⁹. Dadurch sind die Zellen u.a. weniger vor oxidativen Schäden geschützt. Zink, welches lokal im RPE und in den

Melanozyten der Aderhaut durch Verlust von Melanin als auch systemisch im Serum bei AMD erniedrigt ist, kann bestimmte Genexpressionen beeinflussen. Zink wird für zahlreiche u.a. antioxidativ wirkende Enzyme als Co-Faktor benötigt. Ein Mangel bzw. vollständiges Fehlen von Melanin führt z.B. zu folgenden Erkrankungen des Auges: Albinismus, Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS), Chediak-Higashi-Syndrom (CHS), altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Im ZNS korreliert der Morbus Parkinson mit einem Verlust von melaninhaltigen dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra. Der Melaniningehalt des Innenohres korreliert mit der Empfindlichkeit gegen oxidativen Stress verursacht durch Lärm¹⁰.

Eine kausale Therapie für Albinismus, Hermansky-Pudlak-Syndrom und Chediak-Higashi-Syndrom ist bisher nicht bekannt. Bei Albinos wird der extremen Photophobie durch Verwendung von Sonnenbrillen entgegengewirkt.

Eine kausale Therapie der AMD ist derzeit nicht bekannt. Behandlungen durch Argonlaserkoagulation können nur bei nicht subfovealen CNV angewendet werden und sie sind ebenso wie die Photodynamische Therapie nicht in der Lage, Rezidive zu verhindern.

Die derzeit eingesetzten Standardtherapien bei Morbus Parkinson mit L-DOPA zeigen Nebenwirkungen und verlieren nach einigen Jahren oft ihre Wirksamkeit. Auch Dopaminagonisten, MAO-Hemmer, Amantadin und Anticholinergica zeigen Nebenwirkungen oder beeinflussen nur einzelne Auswirkungen der Erkrankung.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Mittel zur Prävention oder Therapie von Erkrankungen bereitzustellen, die durch oxidativen Stress in Zellen hervorgerufen werden. Eine weitere Aufgabe liegt darin, Mittel zur Prävention oder Therapie von Erkrankungen des Auges, des Innenohres und des Zentralnervensystems (ZNS), die mit einem Mangel des Pigmentes Melanin korreliert sind, bereitzustellen.

Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1A zeigt humane RPE Zellen bei denen die Tyrosinase durch PTU gehemmt wurde nach 15 Fütterungen mit Sezellmembranen. Die Zellen zeigen eine intensive, goldgelbe Autofluoreszenz, die für Lipofuszin spezifisch ist.

In Figur 1B ist schematisch gezeigt, dass die Entstehung von Lipofuszin und die damit verbundenen Autofluoreszenz in Zellen kaum vorhanden war, die ansonsten genauso behandelt wurden wie die in Figur 1A gezeigten Zellen, wenn die Tyrosinase nicht durch PTU gehemmt war.

Der hier verwendete Begriff "Tyrosinase" bezeichnet ein Protein oder Polypeptid mit der Aminosäuresequenz spezifisch für ein Enzym mit der biologischen Aktivität der Tyrosinase wie vorstehend beschrieben. Ein Beispiel für eine Tyrosinase ist die humane melanogenetische Tyrosinase (EC 1.14.18.1). Diese Tyrosinase ist ein integrales Membranglycoprotein aus 529 Aminosäuren (GenBank-Nummer M27160). Die Tyrosinase gehört zusammen mit den humanen Tyrosinase-Related Proteinen I+II (TRP I+II) (GenBank-Nummer für TRP I ist AL138753 und für TRP II D17547), Lysosome Associated Membrane Protein (Lamp; GenBank-Nummer P11279) und gp100 (pmel 17) (GenBank-Nummer P40967) zu einer Proteinfamilie. Der Begriff Tyrosinase schließt daher die zu der Proteinfamilie zählenden Proteine mit ein sowie eventuelle Modifikationen der Tyrosinase z.B. posttranslationale Modifikationen.

Ferner umfaßt der Begriff Tyrosinase eine Nukleinsäure mit der Sequenz kodierend für eines der vorstehend erläuterten Polypeptide. Dabei fallen nicht nur die bisher bekannten Sequenzen unter den Begriff sondern auch die Sequenzen die Derivate, d.h. Substitutionen, Additionen, Deletionen, Insertionen, Inversionen umfassen und auch die Sequenzen, die Fragmente und Modifikationen aufweisen. Die Nukleinsäure umfasst nicht nur die jeweilige cDNA, sondern kann ferner den genomischen Locus einschließlich der Introns, Regulationselemente etc. enthalten. Eine Nukleinsäure fällt unter den Begriff Tyrosinase, wenn das von ihr codierte Protein oder Polypeptid die biologische Aktivität der Tyrosinase aufweist.

Der hier verwendete Begriff "Vektor" oder "Gentransfervektor" bezeichnet natürlich vorkommende oder künstlich erschaffene Konstrukte und Organismen zur Aufnahme, Vermehrung, Expression oder Übertragung von Nukleinsäuren in Zellen. Beispiele für Gentransfervektoren sind Viren, wie Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Lentiviren,

Retroviren, Pockenviren, Alphaviren, Bakuloviren, Tollwutviren oder Herpesviren. Die Gentransfervektoren besitzen die Fähigkeit, sich in einer Zelle autonom zu vermehren oder ins Genom der Zellen zu integrieren. Der Gentransfervektor ist so aufgebaut, dass er mindestens ein gewünschtes therapeutisches Polynukleotid in der Art enthält, dass dieses repliziert und/oder exprimiert wird. Ferner können die Gentransfervektoren weitere Polynukleotide wie einen Selektionsmarker enthalten.

Oxidativer Stress wird z.B. durch Phagozytose ausgelöst. Überraschenderweise fand der Erfinder, dass die Tyrosinase und deren Metabolite wie z.B. 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyldopa (CD) Schutzfunktion zu Zeitpunkten erhöhter Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies bieten können und Zellen und Gewebe vor oxidativem Stress schützen.

Unter oxidativem Stress versteht man die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellen oder Geweben. Diese Sauerstoffspezies sind Superoxidanion, Hydroxylradikal und H_2O_2 . Diese Species entstehen zum Beispiel bei den Reaktionen der Atmungskette in den Mitochondrien jeder Zelle. Das Risiko einer Zellschädigung steigt, wenn das Gewebe hohe Stoffwechselaktivität hat (z.B. Gehirn) oder stark lichtexponiert ist (Auge, Haut). Die Sauerstoffspezies (Superoxidanion, H_2O_2) werden durch antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und andere) eliminiert. Gelingt diese Elimination jedoch nicht vollständig, entsteht Hydroxylradikal, welches schwere Zellschäden und Zelltod verursacht. Zellalterung und Alterung ganzer Organismen werden auf die Schäden zurückgeführt, die durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht werden. Ein sehr bekannter Zellschaden durch oxidativen Stress ausgelöst ist die Lipidperoxidation. Oxidativer Stress verursacht neurologische degenerative Erkrankungen (z.B. Morbus Parkinson, Altersbedingte Makuladegeneration, Alzheimer, degenerative Erkrankungen des Innenohres) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (z.B. Herzinfarkt, Arteriosklerose) aber auch Tumorentstehung (z.B. Melanom).

Lipofuszin ist ein braun-gelbes, elektronendichtes, autofluoreszierendes Pigment, das in den Lysosomen postmitotischer Zellen z.B. Nervenzellen, Herzmuskelzellen, Pigmentepithelzellen des Auges und Hautzellen, insbesondere wenn sie oxidativem Stress ausgesetzt sind, akkumuliert. Oxidativer Stress verursacht Lipidperoxidation. Diese peroxidierten Lipide lassen sich nicht mehr vollständig abbauen und werden teilweise in Lipofuszin überführt. Lipofuszin ist

besonders im retinalen Pigmentepithel von erheblicher pathologischer Bedeutung und wird vermutlich durch unvollständigen Abbau von Sehzellaußengliedern verursacht. Diese werden wegen ihres hohen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren besonders leicht in Lipofuszin überführt, wenn reaktive Sauerstoffspezies vorhanden sind. Durch den Gehalt an Lipofuszin kann auf das Alter einer Zelle geschlossen werden. Die Lipofuszinflecken in der Haut alternder Menschen werden als Alterspigment bezeichnet. Die genaue chemische Zusammensetzung des Lipofuzins ist nicht bekannt. Eine Komponente besteht aus Ethanolamin.

Drusen sind Ablagerungen von zellulärem Restmaterial unbekannter Herkunft unter dem Pigmentblatt, zwischen oder innerhalb der Bruch'schen Membran und dem RPE. Es ist möglich, dass sie als Folge von Phagozytose- und Abbaustörung retinaler Pigmentzellen entstehen; und es ist sicher, dass bei komplexen Erkrankungen des Retina-, Pigmentepithel-, Aderhautkomplexes, einschließlich AMD beim Menschen, Drusen eine Rolle spielen. Funduskopisch unterscheidet man sogenannte weiche Drusen mit unscharfer Begrenzung oder harte Drusen mit scharfen Grenzen. Entstehen Drusen im Bereich der Makula, ist dieses mit starkem Visusverlust verbunden.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht daher in der Bereitstellung von 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyl dopa (CD) als Arzneimittel. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Verwendung von Tyrosinase, 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyl dopa (CD) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Prophylaxe von Erkrankungen, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden. Insbesondere werden die Arzneimittel zur Behandlung von Drusen oder eines erhöhten Gehalts an Lipofuszin oder zur Prophylaxe der Drusenbildung oder Lipofuszinbildung verwendet. Vorzugsweise umfassen die Erkrankungen Erkrankungen des Auges insbesondere altersbedingter Makuladegeneration (AMD), Albinismus, Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS), Chediak-Higashi-Syndrom (CHS), choroidaler und retinaler Neovaskularisation, diabetischer Retinopathie und Retinopathie der Frühgeborenen, degenerative Erkrankungen des Innenohres (Presbycusis) und Erkrankungen des ZNS insbesondere Morbus Parkinson.

Das Therapeutikum kann jedoch nicht nur in Form einer chemischen Substanz (5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und 5-S-Cysteinyl dopa

(CD) oder eines Proteins oder Polypeptids (Tyrosinase) verabreicht werden, sondern auch in Form eines Nukleinsäuremoleküls, welches das Polypeptid kodiert. Das Nukleinsäuremolekül kann dabei mit Hilfe von Gentransfervektoren in die Zielzellen eingebracht werden.

Die Expression der Tyrosinasegens in den Gentransfervektoren steht unter der Kontrolle von Promotoren. Virale oder nicht-virale Promotoren, die konstitutiv, gewebespezifisch oder regulierbar aktiv sind, können für die Expression verwendet werden. Der SV40- oder Zytomegalie-Virus-Promoter kann z.B. zur konstitutiven Expression eines Gens verwendet werden. Die Verwendung des gewebespezifischen Promoters erlaubt die gewebespezifische Expression z.B. in Melanozyten, IPE- oder in RPE-Zellen. Ein Beispiel für einen solchen gewebespezifischen Promoter ist der Transthyretin-Promoter, der eine gute Aktivität in RPE- und in IPE-Zellen hat. Die Genexpression kann quantitativ und qualitativ durch die Verwendung eines regulierbaren Expressionssystems kontrolliert werden. Ein Beispiel für ein regulierbares Genexpressionssystem ist das Tetrazyklin-abhängige Genexpressionssystem oder das RU 486-System.

Sowohl virale als auch nicht-virale Vektoren können für den Gentransfer in die Zielzellen verwendet werden. Beispiele für virale Vektoren sind adenovirale Vektoren, AAV Vektoren, retrovirale Vektoren und lentivirale Vektoren. Beispiele für nicht-virale Vektoren sind Liposomen und kationische Lipide. Ferner kann jede Art von Vektor oder Träger verwendet werden, der die Nukleinsäure in die Zielzelle einführen kann.

Die Vektoren können zur Behandlung von Erkrankungen des Auges z.B. subretinal oder in die Aderhaut injiziert werden. Zur Behandlung von Erkrankungen des ZNS können Vektoren z.B. in die Substantia nigra, das Putamen oder Striatum injiziert werden. Bevorzugte Zielzellen sind stromale Knochenmarkszellen, Fibrozyten, Melanozyten, retinale Pigmentepithelzellen, Pigmentepithelzellen der Iris und des Ciliarkörpers, Perizyten, Endothelzellen, dopaminerge Neurone, Neurone, Schwann'sche Zellen, Astrozyten, Mikroglia, Müllerzellen oder neuronale Gliazellen.

In einer bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung wird die Bildung von Tyrosinase durch genetische Modifikation von RPE-Zellen mit adenoviralen Vektoren induziert, wodurch das retinale Gewebe vor lichtinduziertem oxidativem Stress geschützt wird und ferner die

Bildung von Lipofuszin und eine Neovaskularisation reduziert wird. Z.B. sind bei Patienten mit AMD bis zu 60 % des Zellvolumens der RPE Zellen mit Lipofuszin gefüllt, was die Funktion der Zellen beeinträchtigt. Ferner kann die Tyrosinase zur Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies z.B. H_2O_2 , Superoxidanion und Hydroxylradikale in Lysosomen verwendet werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung der vorliegenden Erfindung wird die Bildung von Tyrosinase durch genetische Modifikation von Zellen des ZNS mit adenoviralen Vektoren induziert, was Steigerung der Dopaminsynthese und zur Bindung von Eisen und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Metabolite der Tyrosinase führt. Ferner wird dadurch die lysosomale Aktivität in Neuronen aktiviert.

Bevorzugt ist die Verwendung der Tyrosinase bei Pigmentmangelkrankungen und Hypopigmentierung aller Art, z.B. Vitiligo, Alopecia, Graying of Hair, Achromatosis, Piebaldismus, Albinismus, Retinopathy of the Prematurity (ROP), Retinitis pigmentosa, Diabetische Retinopathie, altersbedingte Makuladegeneration, Morbus Parkinson, Hermansky-Pudlak-Syndrom, Chediak-Higashi-Syndrom,

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht ferner in der genetischen Modifikation von Zellen, die dann dem Patienten appliziert werden. Die Zellen können dabei mit den vorstehend beschriebenen Gentransfervektoren transduziert werden. Die Zellen können ferner mit dem Nukleinsäuremolekül, umfassend das Tyrosinasegen, transfiziert werden.

Bei Erkrankungen des Auges können z.B. Zellen aus der Nebennierenrinde, Pigmentepithelzellen der Iris, retinale Pigmentepithelzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark, Sertolizellen aus den Keimdrüsen, Glomuszellen aus den Carotiden, Fibroblasten oder Astrozyten, neuronale Stammzellen oder andere körpereigene Zellen durch genetische Veränderung mit dem Tyrosinasegen vor oxidativen Schäden in der Aderhaut (z.B. an Endothelzellen) oder Retina schützen. Die hier genannten Zellen können sowohl von Feten als auch autolog gewonnen werden. Gleichzeitig kann die lysosomale Aktivität der Zellen gesteigert werden, was die Bildung von Lipofuszin verringert. Durch Bildung von DOPA kann die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) angeregt werden, was sich positiv auf den Blutfluß in der Aderhaut auswirkt. Diese Mechanismen verhindern Neovaskularisation bei Augenerkrankungen z.B. altersbedingte Makuladegeneration, diabetische Retinopathie oder Retinopathy of the Prematurity.

Beispielsweise können fetale Zellen, gewonnen aus Gehirnen von menschlichen Feten z.B. aus dem ventralen Mittelhirn oder dopaminerge Neurone verwendet werden. Ferner können eine Reihe von verschiedenen Zelltypen, darunter auch nicht neuronale Zellen z.B. Zellen aus der Nebennierenrinde, Pigmentepithelzellen der Iris, Stammzellen aus dem Knochenmark, Sertolizellen aus den Keimdrüsen, Glomuszellen aus den Carotiden, Fibroblasten oder Astrozyten oder neuronale Stammzellen z.B. aus Gehirnen von adulten Vertebraten verwendet werden.

Bei Morbus Parkinson können transplantierte, mit dem Tyrosinase-Gen modifizierten Zellen, durch die antioxidative Wirkung ihrer Melaningranula neuroprotektive Wirkung entfalten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführung der Erfindung sollen dopaminerge Neurone oder andere neuronale Zellen des ZNS mit dem Tyrosinasegen bei Patienten mit Morbus Parkinson transduziert werden, um dort einerseits die Melaninbildung anzuregen und/oder andererseits die Dopaminproduktion zu fördern. Vorzugsweise sind die verwendeten Zellen autologe Zellen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung von 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyl dopa (CD) als Arzneimittel. Die Substanzen können nicht nur als chemische Substanzen verabreicht werden, sondern entstehen auch bei der Verabreichung von Tyrosinase-Polypeptiden oder bei der gentherapeutischen Modifikation von Zellen mit dem Tyrosinasegen. Durch die Expression von Tyrosinase entstehen die erfindungsgemäßen Substanzen als Zwischenstufen der Melaninsynthese und können z.B. von den modifizierten Zellen des RPE in die Aderhaut oder Netzhaut, oder von den modifizierten ZNS-Zellen ins ZNS diffundieren und dort aktiv die beschriebenen Schutzfunktionen ausüben.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung einer Kombinationszusammensetzung aus einerseits 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA), 5-S-Cysteinyl dopa (CD) und/oder Tyrosinase und andererseits Zink als Arzneimittel. Insbesondere betrifft die Erfindung die Bereitstellung der Kombinationszusammensetzung zur Behandlung von altersbedingte Makuladegeneration,

diabetische Retinopathie, Morbus Parkinson, zur Reduzierung der Neubildung von Blutgefäßen, von Lipofuzin und von Drusen und degenerativen Erkrankungen des Innenohres (Presbycusis).

Dabei kann Zink gleichzeitig oder nach den anderen in der Kombinationszusammensetzung verwendeten Substanzen verabreicht werden. Vorzugsweise wird zuerst die Konzentration an Melanin in den von den Erkrankungen betroffenen Zellen, z.B. der Aderhaut, der Substantia Nigra oder im RPE, mittels Verabreichung der vorstehend beschriebenen Gentransfervektoren erhöht. Anschließend wird dann die Konzentration von Zink in den künstlich pigmentierten Geweben durch Substitution mit Zink erhöht, wodurch dann die antioxidativen Schutzeffekte des Melanins und seiner Metaboliten verbessert werden¹¹. Die Verabreichung von Zink kann auf oralem Weg erfolgen. Die Blutgefäße der Aderhaut und Neuronale Zellen im ZNS können geschützt werden, indem oxidativer Stress reduziert wird. Die Neubildung von Blutgefäßen, die Entstehung von Lipofuzin und Drusen kann durch die erfindungsgemäße Kombinationsbehandlung reduziert werden.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Induktion von Tyrosinase durch Phagozytose in vitro

Humane retinale Pigmentepithelzellen wurden 2 Stunden post mortem aus Organspenderaugen isoliert, in dem sie in 0,2 % Trypsinlösung mit 0,5 mM EDTA (soweit nicht anders angegeben stammten die Reagenzien von Sigma, Deisenhofen, Germany) 30 min inkubiert wurden. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 24 Well plates (Nunc, Mainz, Germany) in Dulbeccos modified Eagle Medium mit 15 % fötalem Kälberserum, 50 µg/ml Gentamycin und 2,5 µg/ml Amphotericin kultiviert. Die Zellen blieben 3 Wochen bis zur Konfluenz in Primärkultur (P0). Nachfolgende Passagierung erfolgte durch Trypsinierung der Zellen in den entsprechenden Zeitintervallen. Für die Fütterung mit Sehzellmembranen wurden Zellen von 3 verschiedenen Spendern (Passage 3, 6 und 16 benutzt).

Beispiel 2: Isolation von Sehzellmembranen

Isolierte Netzhäute aus Rinderaugen wurden 2 min in KCL-Puffer (0.3 M KCl, 10 mM Hepes, 0.5 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ and 48% sucrose) bei pH 7 kräftig geschüttelt und dann bei 2000 rpm in einer Tischzentrifuge (Type ZJ 1, Christ Germany) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand

wurde filtriert durch einen Mullfingerling und verdünnt mit KCl-Puffer (1:1) und nochmals zentrifugiert bei 2500 rpm für 10 min. Die isolierten Stäbchenaußensegmente wurden zweimal durch Zentrifugation in 10 mM Tris-Puffer (Trizma Base) gewaschen bei pH 4, pelletiert und bis zur Verwendung bei minus 80 Grad eingefroren.

Beispiel 3: Phagozytose von Sehzellmembranen

RPE Zellen, die 2 Wochen an die Kulturbedingungen adaptiert waren, wurden mit ca. 2×10^6 Stäbchenaußensegmenten überschichtet. Nach 4 Stunden wurden die nicht phagozytierten Sehzellmembranen ausgewaschen und durch frisches Medium ersetzt. Nach 0, 5, 20 und 40 Stunden wurden die Zellen in 4 % Paraformaldehyd fixiert oder in Trireagent aufgelöst und für die verschiedenen Auswertungen verwendet. Als Kontrollen dienten ungefütterte Zellen.

Beispiel 4: Histochemischer Nachweis von Tyrosinase mit DOPA

Ein Teil der Zellen wurden ungefüttert bzw. 20 Stunden nach Inkubation mit Sehzellmembranen in 2 % Glutaraldehyd in 100 mM Natriumkakodylatpuffer 2 Stunden fixiert (pH 6,8) und mit 5 mM L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Routinemethode für die Elektronenmikroskopie eingebettet, ultradünngeschnitten und in einem Zeiss EM 9 (Oberkochem, Germany) Elektronenmikroskop ausgewertet.

In gefütterten Zellen waren elektronendichte Golgiapparate und zahlreiche cytoplasmatische Vesikel vorhanden. Gelegentlich waren Phagosomen nachweisbar, die als Folge der DOPA Reaktion elektronendicht geworden waren. In ungefütterten Zellen wurde elektronendichtes Material als Folge der DOPA Reaktion nicht gefunden.

Beispiel 5: Nachweis von Tyrosinase durch Immunhistochemie an kultivierten Zellen

Auf Objektträgern kultivierte Zellen wurden fixiert in 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PBS für 15 min., gewaschen in 0,05 M TBS (Trishydroxymethylaminomethane), permeabilisiert in 0,25 % Triton (Serva) und blockiert mit 5 % BSA (Bovine Serum Albumine) für 40 min.. Die Zellen wurden mit dem 1. anti-Tyrosinase monoklonalen Antikörper (Chemicon International Inc.) (1:150) über Nacht inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Cy2 konjugierten Antikörper (AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Dianova) (1:100) dauerte 1 Stunde. In einem weiteren Schritt wurden die Präparate mit anti-Rhodopsin Antikörpern (Leinco Techn Instr., verdünnt 1:50) über Nacht inkubiert. Die primären Antikörper wurden mit anti-Maus IgG gekoppelt an den

Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) sichtbar gemacht. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Es jeweils 6 Gesichtsfelder mit ca. 50 Zellen analysiert.

	Zellen mit Tyrosinase enthaltenden Vesikeln in %	Zellen mit Tyrosinase und Rhodopsin enthaltenden Vesikeln in %
24 Stunden nach Inkuba- tion mit ROS	$8 \pm 10,2$ $n = 6$	$0,5 \pm 0,6$ $n = 6$
Ohne ROS	$1 \pm 1,3$ $n = 6$	0 ± 0 $n = 6$
student's t-test	$p = 0,00019$	

Beispiel 6: Nachweis von Tyrosinase in retinalen Pigmentepithelzellen von Ratten

Augen von Long Evans Ratten, die unter einem 12 Stunden hell-dunkel Lichtzyklus gehalten wurden (Licht an um 7 Uhr morgens), wurden um 8 Uhr und 10 Uhr entnommen. Die Augen wurden enukleiert, in Höhe des Limbus mit einem Scalpel angestochen und über Nacht in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Am nächsten Tag wurde der Vorderabschnitt der Augen bis kurz hinter die Ora serrata durch einen umlaufenden Schnitt abgetrennt. Durch 4 radiale Schnitte wurde der verbleibende Augenbecher in Quadranten geteilt und die Netzhäute wurden entfernt. Quadranten, bestehend aus Pigmentepithel, Chorioidea und Sklera, die Lasernarben enthielten, wurden 4 x 10 min in Tris-Puffer (TBS) und dann 10 min in 0,5 M NH_4Cl und 0,25 % Triton (Serva, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Nach zwei weiteren Spülungen wurden die Präparate mit 5 % BSA (Albumin, Bovine Fraktion) inkubiert. Die Flatmounts wurden mit Anti-Rhodopsin- und anti-Tyrosinase Antikörpern inkubiert, wie für die kultivierten Zellen beschrieben wurde. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase aus Ratten- Phäochromocytom (Boehringer, Mannheim, Germany) 1:500 verdünnt inkubiert. Die „Flatmount-Präparate“ wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Die Präparate wurden mit den entsprechenden Filtersets für Cy2 und Cy3 getrennt mit einer digitalen Kamera photographiert und mit Openlab Software (Improvision, UK) überlagert. Zellen, die Tyrosinase positive, Tyrosinase und Rhodopsin positive Vesikel enthielten wurden gezählt. Alle Zellen waren negativ

für Tyrosinhydroxylase. Die Anzahl der positiven Zellen ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Es wurden jeweils Gesichtsfelder mit im Mittel 250 Zellen ausgewertet.

	Zellen mit Tyrosinase enthaltenden Vesikeln in %	Zellen mit Tyrosinase und Rhodopsin enthaltenden Vesikeln in %
8 Uhr	$0,6 \pm 0,3$ $n = 23$	$0,3 \pm 0,3$ $n = 11$
10 Uhr	$1,2 \pm 3,3$ $n = 30$	$0,2 \pm 0,4$ $n = 16$
student's t-test	$p = 0,01$	

Beispiel 7: Hemmung der Tyrosinase verstärkt die Bildung von Lipofuszin in RPE Zellen

Humane RPE Zellen, die 2 Wochen an die Kulturbedingungen adaptiert waren, wurden in 3 Versuchsgruppen eingeteilt.

- 1.) Die Zellen bekamen 1 mM Phenylthioharnstoff (Phenylthiourea PTU, Sigma, Deisenhofen, Germany), einen Inhibitor der Tyrosinase ins Kulturmedium
- 2.) Die Zellen in Gruppe 2 wurden zur Kontrolle ohne PTU kultiviert
- 3.) Die Zellen in Gruppe 3 wurden wie in Gruppe 1 mit PTU kultiviert aber nicht gefüttert.

Die Zellen in Gruppe 1+2 wurden mit ca. 2×10^6 Stäbchenaußensegmenten überschichtet. Die Konzentration von PTU blieb stets konstant. Nach 4 Stunden wurden die nicht phagozytierten Sehzellmembranen ausgewaschen und durch frisches Medium ersetzt. Dieses geschah an 15 aufeinanderfolgenden Tagen. Danach wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss Oberkochen, Germany) mit Filtern angeschaut, die für die Autofluoreszenz des Lipofusins spezifisch sind (Anregung 360 nm, Emission 540 nm, Feuerbacher Analysentechnik, Tübingen, Germany) und wurden mit einer digitalen Kamera photographiert und mit Openlab Software (Improvision, UK) gespeichert.

RPE Zellen der Gruppe 1 bei denen die Tyrosinase durch PTU gehemmt wurde, zeigten nach der 15 tägigen Fütterung mit Sehzellmembranen intensive, goldgelbe Autofluoreszenz, die für Lipofuszin spezifisch ist (Abb.1a). Diese Autofluoreszenz war in Zellen der Gruppe 2 nur schwach ausgeprägt (Abb.1b). Zellen, die nur mit PTU inkubiert wurden (Gruppe 3) zeigten keine Autofluoreszenz. Tyrosinase verhindert die Entstehung von Lipofuszin im retinalen Pigmentepithel.

Beispiel 8: Western Blot

Western Blot wurde mit kultivierten humanen RPE-Zellen vor und 5 und 40 Stunden nach Fütterung mit Sekzellmembranen durchgeführt. Zwei Melanomzelllinien wurden zur Kontrolle der Tyrosinaseexpression mitverwendet. Die Proteinproben (je 75 µg) wurden entweder auf eine NC-membrane (M1) oder eine PVDF-membrane (polyvinylidene difluoride membrane, M2) aufgetragen. M1 wurde gewaschen in TBS, mit India Ink gefärbt und nochmals gewaschen. M2 wurde mit Aqua dest. gewaschen, mit PonceauS gefärbt und nochmals gewaschen. Die Reaktion wurde gestoppt mit 5% BLOT- Quick Blocker (Chemicon) und TBS-T (0,05 % Tween-20, 1xTBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Proben wurden mit 20 ml Maus anti-Tyrosinase monoklonalem Antikörper (DUNN/Chemicon MS 800) 1:500 verdünnt in TBS-T bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Waschen mit 20 ml TBS wurde der sekundäre Antikörper HRP-anti-mouse IgG (Horse radish peroxidase, Verdünnung 1:6000 in TBS-T) 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann ausgewaschen. Alle Proben wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes β -Aktin (Sigma, Deisenhofen, Germany) 1:800 verdünnt über Nacht inkubiert. Peroxidase wurde sichtbar gemacht mit LumiLight 1:1 Vol. Luminol/Enhancer. Die Peroxidaselösung wurde in einem Plastikfilm inkubiert.

Eine stark positive Bande mit Molekulargewicht von 75 KD zeigte sich in den Melanomzellen. Die gleiche Bande war in ungefütterten RPE Zellen sehr schwach nachweisbar und verdoppelte sich in der Dicke 5 Stunden nach Fütterung, um 40 Stunden nach Fütterung auf ihren Ausgangswert vor der Fütterung zurückzukehren. Die Intensität der Banden für β -Aktin blieb in allen Proben konstant.

Die Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Tyrosinaseexpression auf Proteinebene als Folge der Inkubation mit Sekzellmembranen.

Beispiel 9: Erhöhung der intrazellulären Zinkkonzentration in pigmentiertem Gewebe

Zwei Albino (Wistar) Ratten und 2 pigmentierte (Long Evans) Ratten wurden intraperitoneal mit 40 mg/Kg Körpergewicht ZnCl_2 injiziert. Nach 24 Stunden wurde der Chorioidea-RPE-Komplex von Retina und Sklera isoliert. Entsprechende Proben von unbehandelten Tieren dienten als Kontrollen. Die Proben wurden direkt in dicht schließende PFA-vessels (Savillex) eingewogen

(Microbalance Sartorius MC21S) und mittels Ultraschallhomogenisierung für 24h bei 30°C mit $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (suprapur grade reagents; Merck) aufgeschlossen. Nach vorsichtiger Evaporation wurden die Reste in 2 % HNO_3 für 5 h bei 50°C gelöst. Diese Lösung wurde dann in einen 10 ml volumetrischen Kolben überführt. Die entgültige klare Lösung enthielt 10 ng Rhodamin (Rh)/ ml^{-1} und wurde mit HNO_3 2% aufgefüllt. Der Nachweis von Zink wurde mit induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS, ELAN 6000 Perkin-Elmer/Sciex) und unter Verwendung von Rh als internem Standard und einer Kalibrierung mit chemischen Reagentien des höchsten Reinheitsgrades durchgeführt.

Die Zinkkonzentration des Chorioidea-RPE Komplexes betrug bei unbehandelten Albinoratten 5,1 $\mu\text{g/g}$, bei pigmentierten Ratten 74 $\mu\text{g/g}$ und stieg im Gewebe von Albinos nicht an (6,5 $\mu\text{g/g}$), erhöhte sich jedoch um den Faktor 1.6 in pigmentierten Ratten (125 $\mu\text{g/g}$) 24 Stunden nach Injektion von Zink. In pigmentierten Ratten war die Endkonzentration an Zink nach Injektion 19 mal höher als in den entsprechend behandelten Albinos.

Beispiel 10: Erhöhung der intrazellulären Zinkkonzentration und weiter Elemente in künstlich pigmentiertem Gewebe

In 8 Augen von Albino (Wistar) Ratten wurde subretinal 0,008 mg Melanin von Tintenfischen (*Sepia officinalis*, Sigma) gelöst in 1 μl physiologischer Salzlösung injiziert. Nach 3 Tagen wurden die Tiere intraperitoneal mit 40 mg/Kg Körpergewicht ZnCl_2 injiziert. Entsprechende Proben von unbehandelten Albinos dienten als Kontrollen (4 Augen). Nach 24 Stunden wurden die künstlich pigmentierten Chorioidea-RPE-Komplexe isoliert von Retina und Sklera. Die Proben wurden direkt eingewogen (Microbalance Sartorius MC21S) in 7 ml dicht schließende PFA-vessels (Savillex) und aufgeschlossen (24h/30°C mit Ultraschallhomogenisierung) mit $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ (suprapur grade reagents (Merck)). Der Nachweis von Zink wurde mit induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie durchgeführt wie zuvor beschrieben.

Die Zinkkonzentration des Chorioidea-RPE Komplexes war in künstlich pigmentierten Geweben 49,6 $\mu\text{g/g}$ und ohne Melaninjektion 5,1 $\mu\text{g/g}$. Das entspricht einer Erhöhung der Zinkkonzentration um den Faktor 9,7 im Vergleich zu Gewebeproben von unbehandelten Albinoratten erhöht 24 Stunden nach Injektion von Zink. Auch die Konzentration der Elemente Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu und Cd wurde durch Injektion von Melanin deutlich erhöht in Richtung der Werte, die bei pigmentierten Tieren normal sind (siehe nachstehende Tabelle).

Tabelle: Konzentrationen in µg/g Nassgewicht RPE-Chorioidea-Komplex

	Ca	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd
Albino-Ratte	37	0,11	7,7	0,01	0,33	0,77	5,1	0,01
Albino Ratte + Melanininjektion	634	0,65	97	0,08	1	5,08	49,6	0,02
pigmentierte Ratte	2823	1,56	94	0,13	4	14,1	74	0,07

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch eine künstliche Erhöhung der Melaninkonzentration die Konzentration an Spurenelementen im Gewebe erhöht werden kann. Diese Erhöhung kann einerseits die physiologischen Funktionen der Zellen unterstützen, andererseits können auch toxische Elemente (Fe, Cd) vom Melanin fest gebunden werden, so dass das Zytoplasma der Zellen vor den schädlichen Auswirkungen dieser Elemente geschützt wird.

Beispiel 11: Erhöhung der mRNA für Katalase durch Injektion von Zink

Albino (Wistar) Ratten und pigmentierte (Long Evans) Ratten wurden intraperitoneal mit 40 mg/Kg Körpergewicht ZnCl_2 injiziert. Nach 6 und 24 Stunden wurde der Chorioidea-RPE-Komplex isoliert von Retina und Sklera. Die Menge an Katalase mRNA Expression in Chorioidea-RPE-Komplex wurde mit Real Time RT-PCR mit dem SYBR Green I Reactionssystem in einem iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) quantifiziert. PCR-Primer (Katalase: upper primer: TAG CCA GAA GAG AAA CCC ACA AAC T (SEQ ID NO:1) und lower primer: TCC CTC GGT CGC TGA ACA AGA (SEQ ID NO:2); GAPDH: upper primer AAC TTT GTG AAG CTC ATT TCC TGG TAT (SEQ ID NO:3) und lower primer: CCT TGC TGG GCT GGG TGG T (SEQ ID NO:4)) wurden mit der Primeranalyse-Software OLIGO®4.1 (National Biosciences, Plymouth, MN) so ausgesucht, dass die primerspezifische Schmelztemperatur zwischen 58 und 60°C lag. Die Länge der Fragmente betrug 116 bp (Katalase) und 123 bp (GAPDH). Die Analyse der Genexpression wurde dreimal wiederholt. 25 ng cDNA wurden mit Reaktionspuffer mit Tris-HCl, KCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM von jedem dNTP, 0.2 µM von jedem Primer, 0.1x SYBR Green I (Molecular Probes Europe, Leiden, Netherlands) und 1,2 U HotStart DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) in einem Volumen von je 50 µl pro Ansatz einer Amplifikation unterzogen. Folgende PCR Parameter wurden verwendet: Initiierung bei 95 °C für 15 min., dann 40 Zyklen bei 95 °C

für 20 sec., 55 °C für 20 sec. und 72 °C für 20 sec. Um die Amplifikationspezifität zu prüfen wurden die PCR Produkte einer Schmelzpunktanalyse unterzogen. Die Quantifizierungsdaten wurden mit der iCycler iQ System Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) berechnet. Nach Abzug der PCR Basislinie durch die Software wurde der lineare logarithmische Anteil der Fluoreszenz versus Zykluszahl aufgetragen, um die Zykluszahl (threshold cycle, C_T) zu bestimmen bei der die Schwellenwertfluoreszenz für Katalase und GAPDH als Referenz überschritten wurde. Da die Amplifikationseffektivität von Ziel- und Referenzgen annähernd gleich war ($\Delta C_T < 0.15$), wurde die vergleichende C_T Methode zur Quantifizierung der Katalase im Verhältnis zu GAPDH verwendet.

Die Konzentration der mRNA für Katalase ohne Zinkinjektion war in Chorioidea-RPE-Komplexen von Albinos und pigmentierten Tieren genau gleich. Sechs Stunden nach Zinkinjektion war die mRNA für Katalase um den Faktor 12 erhöht. Nach 24 Stunden war dieser Unterschied verschwunden und Menge an mRNA für Katalase war wieder so hoch wie ohne Zinkinjektion. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass Melanin die durch Zink induzierte Genexpression für Katalase, möglicherweise durch eine gesteigerte intrazelluläre Aufnahme, fördert.

Beispiel 12: Melanin schützt vor Netzhautdegeneration, die durch Zinkmangel verursacht wurde.

Fünf Monate alte Albino (Wistar) Ratten und pigmentierte (Long Evans) Ratten wurden 42 Tage ausschließlich mit zinkarmer Diät (C1040, Altromin GmbH, Lage, Germany, Chargen Nr. 436) gefüttert. Die Augen wurden enukleiert und für die Elektronenmikroskopie nach Routinemethoden in Kunststoff eingebettet. An Semidünnschnitten wurden die noch vorhandenen Photorezeptoren in 4 Augen pro Gruppe ausgezählt. Pro Auge wurde die maximale Zahl der Photorezeptorreihen an 3 verschiedenen Stellen gezählt. Die Ergebnisse wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet.

In beiden Versuchsgruppen war ein Photorezeptorverlust zu beobachten. Die Mittelwerte aus 12 Messungen der maximal vorhandenen Photorezeptorzellkerne betrug bei Albinoratten $5,3 \pm 1$ und bei pigmentierten Ratten $9,6 \pm 0,6$. Der Unterschied ist hoch signifikant ($p = 0,00001$). Die Photorezeptoraußensegmente waren bei pigmentierten Ratten etwa doppelt so lang wie bei Albinos. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass Melanin vor Netzhautdegeneration, verursacht

durch Zinkmangel, schützen kann. Wahrscheinlich konnte das in den Melanosomen gespeicherte Zink abgegeben werden, so dass die zinkabhängigen Zellfunktionen bei den pigmentierten Tieren besser und länger funktionierten als bei den Albinos.

Beispiel 13: Zink in Kombination mit Melanin schützt Zellen vor letaler UVA Strahlung

30.000 humane amelanotische retinale Pigmentepithelzellen ARPE-19 (American Type culture Collection, Manassas, VA, USA) wurden in einer Mischung von DMEM and F12 Medium (PAA Laboratories, Linz, Austria) mit 10 % fötalem Kälberserum, Gentamycin und Amphotericin kultiviert und wurden mit 1mg/ml Melanin von Tintenfischen (*Sepia officinalis*, Sigma) inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das nicht phagozytierte Melanin gründlich ausgewaschen. Nach 24 Stunden wurden die künstlich pigmentierten Zellen für 2 Stunden mit 100 oder 200 μmol ZnCl_2 inkubiert. Drei Tage später wurden die Zellen mit einer HRL, 125 W, Lampe (Radium, Germany) 1 Stunde lang bestrahlt. Der UVA Lichtanteil betrug an der Oberfläche der Zellkulturflüssigkeit 18 mW/cm^2 und wurde mit einem RM-12 UV Radiometer (Dr.Gröbel, UV Elektronik, Ettlingen, Germany) gemessen. Zellen ohne Melanin- und Zinkbehandlung mit und ohne Bestrahlung dienten der Kontrolle. Nach 2 weiteren Tagen wurde die Anzahl der überlebenden Zellen in einer Thomakammer ausgezählt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Mittelwerte der überlebenden Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen angegeben. Die Anzahl der überlebenden Zellen nach Bestrahlung ohne Melanin- und/oder Zinkbehandlung wurde mit der Anzahl der überlebenden Zellen mit Behandlung statistisch verglichen. Daher resultiert der p-Wert. Jede Behandlung hat die Überlebensrate der Zellen signifikant erhöht. Den besten Schutzeffekt hatte eine Kombination von Melaningabe und Inkubation mit 100 μmol Zink. Die Zahl der überlebenden Zellen war um den Faktor 7,4 im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht. Dies zeigt, dass eine Kombination aus intrazellulärer Melaninerhöhung und Zinksubstitution retinale Pigmentepithelzellen signifikant vor UVA-Phototoxizität schützt (siehe nachstehende Tabelle).

Ohne Bestrahlung, ohne Zn, ohne Melanin	mit Bestrahlung, ohne Zn, ohne Melanin	mit Bestrahlung, mit 100 μmol Zn	mit Bestrahlung, mit 200 μmol Zn	mit Bestrahlung, mit 100 μmol Zn, mit Melanin	mit Bestrahlung, mit 200 μmol Zn, mit Melanin
335000 \pm 15000	11666 \pm 2886	33333 \pm 11547 p = 0,03	41666 \pm 16072 p = 0,03	86666 \pm 20207 p = 0,003	70000 \pm 25000 p = 0,015

Beispiel 14: Zink in Kombination mit Melanin vermindert die Bildung von H_2O_2 in retinalen Pigmentepithelzellen nach UVA Bestrahlung

30.000 humane amelanotische retinale Pigmentepithelzellen ARPE-19 (American Type culture Collection, Manassas, VA, USA) wurden in einer Mischung von DMEM and F12 Medium (PAA Laboratories, Linz, Austria) mit 10 % fötalem Kälberserum, Gentamycin und Amphotericin kultiviert und wurden mit 1mg/ml Melanin von Tintenfischen (*Sepia officinalis*, Sigma, Deisenhofen, Germany) inkubiert. Nach 4 Stunden wurde das nicht phagozytierte Melanin gründlich ausgewaschen. Nach 24 Stunden wurden die künstlich pigmentierten Zellen für 2 Stunden mit 100 oder 200 $\mu\text{mol ZnCl}_2$ inkubiert. Die so behandelten und unbehandelten Zellen wurden mit 60 μM 2',7'-dichlorofluorescein Diacetate (Sigma, Deisenhofen, Germany), welches fluoresziert wenn es durch H_2O_2 oxidiert wird, inkubiert und 15 Minuten mit einer HRL, 125 W, Lampe (Radium, Germany) bestrahlt. Der UVA Lichtanteil betrug an der Oberfläche der Zellkulturflüssigkeit 18 mW/cm^2 und wurde mit einem RM-12 UV Radiometer (Dr.Gröbel, UV Elektronik, Ettlingen, Germany) gemessen. Zellen ohne Melanin- und Zinkbehandlung mit und ohne Bestrahlung dienten der Kontrolle. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem CytoFluor Multi-well Plate Reader (PerSeptive Biosystems, Wiesbaden Germany) gemessen.

In der Nachfolgenden Tabelle sind die Fluoreszenzintensitäten in Prozent angegeben, wobei geringere Fluoreszenz eine geringere Bildung von H_2O_2 anzeigt. Den besten Schutzeffekt hatte eine Kombination von Melaningabe und Inkubation mit 100 μmol Zink. Die maximale Fluoreszenz in unbehandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde um 60 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert (siehe nachfolgende Tabelle). Dies zeigt, dass eine Kombination aus intrazellulärer Melaninerhöhung und Zinksubstitution retinale Pigmentepithelzellen vor der Bildung von H_2O_2 induziert durch UVA-Licht schützt (siehe nachstehende Tabelle).

Fluoreszenzintensität mit Bestrahlung, ohne Zn, ohne Melanin	Fluoreszenzintensität mit Bestrahlung, mit Melanin und 100 μmol Zn	Fluoreszenzintensität mit Bestrahlung, mit Melanin ohne Zn
100 %	40 %	79 %

Referenzliste

1. C. K. Dorey, G. G. Khouri, L. A. Syniuta, S. A. Curran, J. J. Weiter, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 1047-1054 (1989).
2. C. K. Dorey, X. Torres, T. Swart, *Exp. Eye Res.* 50, 1-10 (1990).
3. C. A. Ferguson and S. H. Kidson, *Pigment Cell Res.* 10, 127-138 (1997).
4. M. Miyamoto and T. B. Fitzpatrick, *Science* 126, 449-450 (1957).
5. T. Sarna, *J. Photochem. Photobiol. B.* 12, 215-258 (1992).
6. U. Schraermeyer and K. Heimann, *Pigment Cell Res* 12, 219-236 (1999).
7. Ebadi M, Leuschen MP, el RH, Hamada FM, Rojas P. *Neurochem Int* 29, 159-166 (1996).
8. Rimbach G, Markant A, Pallauf J, Kramer K. *Z Ernährungswiss* 35, 123-142 (1996).
9. Frank RN, Amin RH, Puklin JE. *Am J Ophthalmol* 127, 694-709 (1999).
10. Barrenas ML, Lindgren F. *Br J Audiol* 25, 303-307 (1991).
11. Tate DJ, Jr., Miceli MV, Newsome DA. *Free Radic Biol Med* 26, 704-713 (1999).

Patentansprüche

1. 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyldopa (CD) als Arzneimittel.
2. Verwendung von Tyrosinase, 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyldopa (CD) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von Drusenbildung, einem erhöhten Gehalt an Lipofuszin, degenerativen Erkrankungen des Innenohres (Presbycusis) Erkrankungen des Auges insbesondere altersbedingter Makuladegeneration (AMD), Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS), Chediak-Higashi-Syndrom (CHS), choroidaler und retinaler Neovaskularisation, diabetischer Retinopathie und Retinopathie der Frühgeborenen, und Erkrankungen des ZNS insbesondere Morbus Parkinson sind.
3. Verwendung von Tyrosinase, 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyldopa (CD) in Kombination mit Zink zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von Drusenbildung, einem erhöhten Gehalt an Lipofuszin, degenerativen Erkrankungen des Innenohres (Presbycusis) Erkrankungen des Auges insbesondere altersbedingter Makuladegeneration (AMD), Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS), Chediak-Higashi-Syndrom (CHS), choroidaler und retinaler Neovaskularisation, diabetischer Retinopathie und Retinopathie der Frühgeborenen, und Erkrankungen des ZNS insbesondere Morbus Parkinson sind.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei Tyrosinase, 5,6-Dihydroxyindol (DHI), 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylsäure (DHICA) und/oder 5-S-Cysteinyldopa (CD) gleichzeitig mit Zink oder vor der Verabreichung von Zink verabreicht werden.
5. Verwendung eines Gentransfervektors umfassend ein Tyrosinasegen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von Drusenbildung, einem erhöhten Gehalt an Lipofuszin, degenerativen Erkrankungen des Innenohres (Presbycusis) Erkrankungen des Auges insbesondere altersbedingter Makuladegeneration (AMD), Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS), Chediak-Higashi-Syndrom (CHS), choroidaler und retinaler

Neovaskularisation, diabetischer Retinopathie und Retinopathie der Frühgeborenen, und Erkrankungen des ZNS insbesondere Morbus Parkinson sind.

6. Transgene Zelle, umfassend zusätzlich zum endogenen Tyrosinasegen ein in die Zelle eingeführtes Tyrosinasegen.

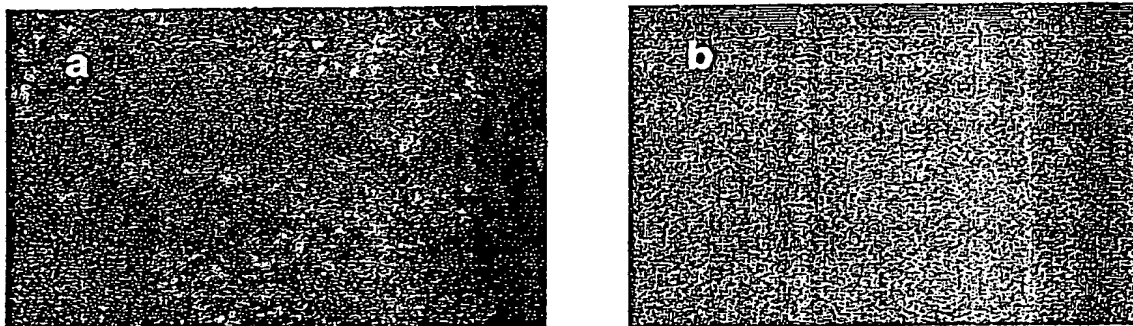


Abb.1

SEQUENCE LISTING

<110> Schraermeyer, Ulrich

<120> Therapie von Erkrankungen des Auges, des Innenohres und des Zentralen Nervensystems

<130> CEV-002 PCT

<140> unknown

<141> 2003-02-12

<150> 102 06 723.6

<151> 2002-02-18

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

tagccagaag agaaaccac aaact

25

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

tccctcggtc gctgaacaag a

21

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 3
aaccttgtga agctcatttc ctggtat

27

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 4
ccttgctggg ctgggtggt

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/00415

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/43 A61K31/404 A61K31/195 A61P25/28 A61P27/02
 //(A61K38/43,33:24),(A61K31/404,33:24),(A61K31/195,33:24)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 07580 A (BIOSOURCE GENETICS CORP) 14 May 1992 (1992-05-14) page 1, line 10-28	1,2,5,6
Y	page 15, line 12 - line 13 page 16 page 23, line 33 - line 36 page 24, line 6 - line 21; claims; examples 8,14,15 ---	1-6
X	WO 00 10507 A (AMATO ROBERT J D ;CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 2 March 2000 (2000-03-02)	2
Y	page 3, line 3 - line 15 page 7, line 29 -page 8, line 7; claims ---	1-6
X	US 5 686 084 A (PROTA GIUSEPPE ET AL) 11 November 1997 (1997-11-11) claims; example 5 ---	1
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 June 2003

Date of mailing of the international search report

14/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Langer, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/DE 03/00415

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ORLOW SETH J: "Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 105, no. 1, 1995, pages 3-7, XP009012745 ISSN: 0022-202X Abstract page 3, column 1, paragraph 1 - paragraph 2	2-5
Y	BARRENAS M-L ET AL: "THE INFLUENCE OF EYE COLOUR ON SUSCEPTIBILITY TO TTS IN HUMANS" BRITISH JOURNAL OF AUDIOLOGY, vol. 25, no. 5, 1991, pages 303-308, XP009012748 ISSN: 0300-5364 cited in the application page 305, column 2	2-5
Y	DOREY C K ET AL: "EVIDENCE OF MELANOGENESIS IN PORCINE RETINAL PIGMENT EPITHELIAL CELLS IN-VITRO" EXPERIMENTAL EYE RESEARCH, vol. 50, no. 1, 1990, pages 1-10, XP009012760 ISSN: 0014-4835 cited in the application Abstract	1-6
Y	PETERS S ET AL: "'Characteristics and functions of melanin in retinal pigment epithelium!" DER OPHTHALMOLOGE: ZEITSCHRIFT DER DEUTSCHEN OPHTHALMOLOGISCHEN GESELLSCHAFT. GERMANY DEC 2001, vol. 98, no. 12, December 2001 (2001-12), pages 1181-1185, XP002245765 ISSN: 0941-293X Abstract page 1181, column 1	1-6
Y	TATE DAVID J JR ET AL: "Zinc protects against oxidative damage in cultured human retinal pigment epithelial cells." FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, vol. 26, no. 5-6, March 1999 (1999-03), pages 704-713, XP002245766 ISSN: 0891-5849 cited in the application Abstract	2,3
P,X	WO 02 066620 A (KOCHANNEK S, SCHRAERMAYER U) 29 August 2002 (2002-08-29) claims	6

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/00415

C ₄ (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>SCHRAERMEYER U ET AL: "Up-regulation of tyrosinase in adult mammalian retinal pigment epithelium by phagocytosis of rod outer segments." PIGMENT CELL RESEARCH, vol. 15, no. Supplement 9, 2002, pages 32-33, XP009012772 XVIII International Pigment Cell Conference; Egmond aan Zee, Netherlands; September 09-13, 2002, 2002 ISSN: 0893-5785 the whole document</p> <p>-----</p>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/00415

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9207580	A	14-05-1992	US 5210076 A	11-05-1993
			AT 176400 T	15-02-1999
			AU 9028891 A	26-05-1992
			CA 2073180 A1	06-05-1992
			DE 69130859 D1	18-03-1999
			DE 69130859 T2	27-01-2000
			EP 0510186 A1	28-10-1992
			ES 2131525 T3	01-08-1999
			JP 5503308 T	03-06-1993
			JP 2002058498 A	26-02-2002
			JP 2002037743 A	06-02-2002
			WO 9207580 A1	14-05-1992
			US 5817631 A	06-10-1998
			US 5776968 A	07-07-1998
			US 5703051 A	30-12-1997
WO 0010507	A	02-03-2000	AU 6313299 A	14-03-2000
			WO 0010507 A2	02-03-2000
			US 2002128304 A1	12-09-2002
US 5686084	A	11-11-1997	AU 705136 B2	13-05-1999
			AU 1022497 A	27-06-1997
			CA 2239191 A1	12-06-1997
			CN 1203523 A	30-12-1998
			EP 0865269 A1	23-09-1998
			JP 2000501704 T	15-02-2000
			TW 467897 B	11-12-2001
			WO 9720542 A1	12-06-1997
			US 6313313 B1	06-11-2001
			US 5827330 A	27-10-1998
			ZA 9609471 A	08-07-1997
WO 02066620	A	29-08-2002	DE 10108412 A1	10-10-2002
			WO 02066620 A2	29-08-2002
			US 2003087859 A1	08-05-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In additionales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00415

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/43 A61K31/404 A61K31/195 A61P25/28 A61P27/02
 //(A61K38/43, 33:24), (A61K31/404, 33:24), (A61K31/195, 33:24)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 07580 A (BIOSOURCE GENETICS CORP) 14. Mai 1992 (1992-05-14) Seite 1, Zeile 10-28	1,2,5,6
Y	Seite 15, Zeile 12 - Zeile 13 Seite 16 Seite 23, Zeile 33 - Zeile 36 Seite 24, Zeile 6 - Zeile 21; Ansprüche; Beispiele 8,14,15 ---	1-6
X	WO 00 10507 A (AMATO ROBERT J D ;CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 2. März 2000 (2000-03-02)	2
Y	Seite 3, Zeile 3 - Zeile 15 Seite 7, Zeile 29 -Seite 8, Zeile 7; Ansprüche --- -/--	1-6

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Juni 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Langer, A

PCT/DE 03/00415

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00415

C.4(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 02 066620 A (KOCHANEK S, SCHRAERMEYER U) 29. August 2002 (2002-08-29) Ansprüche ---	6
P, X	SCHRAERMEYER U ET AL: "Up-regulation of tyrosinase in adult mammalian retinal pigment epithelium by phagocytosis of rod outer segments." PIGMENT CELL RESEARCH, Bd. 15, Nr. Supplement 9, 2002, Seiten 32-33, XP009012772 XVIII International Pigment Cell Conference; Egmond aan Zee, Netherlands; September 09-13, 2002, 2002 ISSN: 0893-5785 das ganze Dokument -----	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In additionales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00415

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9207580 A	14-05-1992	US 5210076 A	11-05-1993
		AT 176400 T	15-02-1999
		AU 9028891 A	26-05-1992
		CA 2073180 A1	06-05-1992
		DE 69130859 D1	18-03-1999
		DE 69130859 T2	27-01-2000
		EP 0510186 A1	28-10-1992
		ES 2131525 T3	01-08-1999
		JP 5503308 T	03-06-1993
		JP 2002058498 A	26-02-2002
		JP 2002037743 A	06-02-2002
		WO 9207580 A1	14-05-1992
		US 5817631 A	06-10-1998
		US 5776968 A	07-07-1998
		US 5703051 A	30-12-1997
WO 0010507 A	02-03-2000	AU 6313299 A	14-03-2000
		WO 0010507 A2	02-03-2000
		US 2002128304 A1	12-09-2002
US 5686084 A	11-11-1997	AU 705136 B2	13-05-1999
		AU 1022497 A	27-06-1997
		CA 2239191 A1	12-06-1997
		CN 1203523 A	30-12-1998
		EP 0865269 A1	23-09-1998
		JP 2000501704 T	15-02-2000
		TW 467897 B	11-12-2001
		WO 9720542 A1	12-06-1997
		US 6313313 B1	06-11-2001
		US 5827330 A	27-10-1998
		ZA 9609471 A	08-07-1997
WO 02066620 A	29-08-2002	DE 10108412 A1	10-10-2002
		WO 02066620 A2	29-08-2002
		US 2003087859 A1	08-05-2003